

JP-2642937

DIALOG(R)File 351:Derwent WPI  
(c) 2002 Thomson Derwent. All rts. reserv.

007557858

WPI Acc No: 1988-191790/198828

XRAM Acc No: C88-085557

Prodn. of polyester(s) by fermentation - using pseudomonas oleovorans,  
excess carbon source and limiting quantity of at least one other  
nutrients

Patent Assignee: RIJKSUNIV GRONINGEN (UYGR-N); UNIV RIJKS TO GRONINGEN  
(UYRI-N)

Inventor: LAGEVEEN R G; WITHOLT B

Number of Countries: 011 Number of Patents: 009

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
EP 274151	A	19880713	EP 87202379	A	19871201	198828 B
NL 8603073	A	19880701	NL 863073	A	19861202	198830
JP 63226291	A	19880920	JP 87305516	A	19871202	198843
US 5135859	A	19920804	US 87127216	A	19871201	199234
EP 274151	B1	19940316	EP 87202379	A	19871201	199411
DE 3789377	G	19940421	DE 3789377	A	19871201	199417
			EP 87202379	A	19871201	
US 5334698	A	19940802	US 87127216	A	19871201	199430
			US 91770180	A	19911002	
CA 1335370	C	19950425	CA 553209	A	19871201	199524
JP 2642937	B2	19970820	JP 87305516	A	19871202	199738

Priority Applications (No Type Date): NL 863073 A 19861202

Cited Patents: 7.Jnl.Ref; A3...8830; EP 89039; JP 61070991; No-SR.Pub

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
-----------	------	-----	----	----------	--------------

EP 274151	A	E	27		
-----------	---	---	----	--	--

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL

US 5135859	A		18		
------------	---	--	----	--	--

EP 274151	B1	E	34		
-----------	----	---	----	--	--

Designated States (Regional): BE CH DE FR GB IT LI NL

DE 3789377	G				Based on patent EP 274151
------------	---	--	--	--	---------------------------

US 5334698	A		20		Div ex application US 87127216
------------	---	--	----	--	--------------------------------

Div ex patent US 5135859

JP 2642937	B2		16		Previous Publ. patent JP 63226291
------------	----	--	----	--	-----------------------------------

Abstract (Basic): EP 274151 A

A process for producing polyesters by aerobically culturing microorganisms with nutrient limitation is characterised by culturing Pseudomonas oleovorans (PO) bacteria under aerobic conditions in a nutrient medium contg. an excess of a carbon source, and a limiting quantity of at least one of the other nutrients essential for growth, the carbon source comprising at least one assimilable acyclic aliphatic hydrocarbon cpd. and if desired, recovering the biopolymer formed from the cells.

USE/ADVANTAGE - The structure of the biopolymer can be easily controlled by selecting the substrate. Polyester type biopolymers can be produced with side chains whose length can be varied in an adjustable manner and which may contain a terminal double bond. Owing to the terminal double bonds, the resulting biopolymer can easily be chemically modified in a controllable percentage of the side chains or cross-linked with other polymer chains. The polyesters obt'd. can be used to form e.g. sutures, films or skin or bone grafts, or can be hydrolysed to produce optically active carboxylic acids or esters.

0/8

Abstract (Equivalent): EP 274151 B

A process for producing polyesters by aerobically culturing micro-organisms with nutrient limitation, characterised by culturing

Page 1

BEST AVAILABLE COPY

JP-2642937

*Pseudomonas oleovorans* bacteria under aerobic conditions in a nutrient medium contg. an excess of a carbon source and a limiting quantity of at least one of the other nutrients essential for growth, and if desired recovering the biopolymer formed from the cells, the carbon source comprising at least one assimilable acyclic aliphatic hydrocarbon cpd. with the exclusion of n-octane.

Dwg.1/8

Abstract (Equivalent): US 5334698 A

Optically-active polyester is isolated from *Pseudomonas oleovorans* cultured in a nutrient medium contg. 1 or more (6-7C) or (9-12C) paraffin prod. or 1 or more (6-12C) paraffin oxidn. prod. as carbon source.

Polyester has units other than exclusively 3-heptanoatetanoate) units having formula  $C(O)CH_2CH_2((CH_2)_mCH_3)O$ , (where m is 2-8).

USE - Used in prepn. of a suture, film, skin graft, or bone graft.

Dwg.1/8

US 5135859 A

Polyesters including units other than 3-hydroxyoctanoate are prepd. by aerobically culturing *Pseudomonas oleovorans* in a nutrient medium contg. excess C-source and a limiting amt. of 1 or more nutrient essential for growth. C-source comprises 1 or more (6-12C) paraffin or paraffin oxidn. prod. other than exclusively n-octane. The polyesters have the formula (I) where n = 2-8. USE - For making sutures, films, skin or bone grafts. The hydrolysed polyester may also be used as a source of optically active acids.

(Dwg.3/8)

Title Terms: PRODUCE; POLYESTER; FERMENTATION; PSEUDOMONAS; OLEOVORANS; EXCESS; CARBON; SOURCE; LIMIT; QUANTITY; ONE; NUTRIENT

Derwent Class: A23; A96; D16; D22; H04; P34

International Patent Class (Main): C08G-063/08; C12P-007/02; C12P-007/62

International Patent Class (Additional): A61L-015/00; A61L-017/00;

A61L-027/00; C08G-063/06; C08G-063/52; C08L-067/02; C12P-007/40;

C12P-007/42; C12P-041/00; C12P-007/62; C12R-001-38

File Segment: CPI; EngPI

Manual Codes (CPI/A-N): A03-C02; A05-E02; A10-A; D09-C01D; D09-D; H04-E02

Plasdoc Codes (KS): 0230 1291 1990 2008 2020 2066 2069 2095 2410 2513 2579

2580 2590 2765 2768

Polymer Fragment Codes (PF):

\*001\* 014 04& 143 144 231 244 295 347 358 399 43& 435 473 516 519 575 58-  
583 584 643 645 691 722

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B P)

(11)特許番号

第2642937号

(45)発行日 平成9年(1997)8月20日

(24)登録日 平成9年(1997)5月2日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 P 7/62			C 1 2 P 7/62	
// A 6 1 L 17/00			A 6 1 L 17/00	
27/00			27/00	C
C 0 8 G 63/06	N L P		C 0 8 G 63/06	N L P
63/52	N P D		63/52	N P D

発明の数 1 (全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願昭62-305516	(73)特許権者	999999999
(22)出願日	昭和62年(1987)12月2日		リジュクスユニバシテイテ テ グロニンゲン
(65)公開番号	特開昭63-226291		オランダ国 9712 ビーシー グロニンゲン, プロアストラット 5
(43)公開日	昭和63年(1988)9月20日	(72)発明者	バーナード ウィゾルト
(31)優先権主張番号	8 6 0 3 0 7 3		オランダ国 9761 エイチアール エルデ, レンブラントヴェッグ 9
(32)優先日	1986年12月2日	(72)発明者	ローランド ゲルハルト ラビゲーン
(33)優先権主張国	オランダ (NL)		オランダ国 9726 シーエル グロニンゲン, ファン ヘムスケルクストラッド 24
		(74)代理人	弁理士 山本 秀策
		審査官	新見 浩一
		(56)参考文献	J. Bacteriol 154 (2) P. 870-878 (1983)

(54)【発明の名称】 酵素によるポリエステル製造方法、光学活性カルボン酸およびエステルの製造方法、およびポリエステルを含む製品

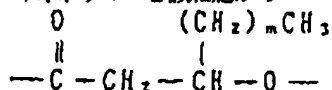
1

2

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】微生物を栄養源制限下で好気的に培養することによって、ポリエステルを製造する方法であって、シュドモナス オレオボランス細菌を好気条件下で、少なくとも1種の資化可能な非環状脂肪族炭化水素化合物を含有する炭素源の過剰量と、生育に必須の他の栄養源の少なくとも1種の制限量とを含有する栄養培地で培養すること；および

必要に応じて、形成されたバイオポリマーを該細胞から\*



ここで、mは2～8の整数である。

【請求項3】次の構造式(1)を有する単位と次の構造式(2)を有する単位とから構成されるポリエステル ※

\*回収すること、

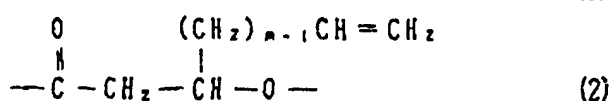
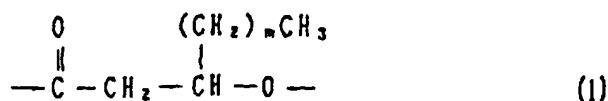
ただし、1種類の炭素源のみを用いる場合はn-オクタンを除く、を包含する方法。

【請求項2】次の構造式(1)を有する単位から構成されるポリエステルを、6～12個の炭素原子を有するパラフィンまたはパラフィン酸化物を1種またはそれ以上含有する炭素源を用いることによって、生産することと特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法：

(1)

※を、6～12個の炭素原子を有する非分岐1-オレフィンの1種またはそれ以上を含有する炭素源を用いることによって、生産することと特徴とする特許請求の範囲第1

項に記載の方法：

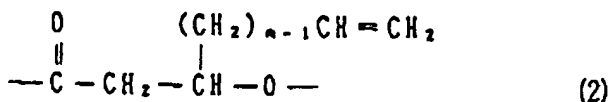
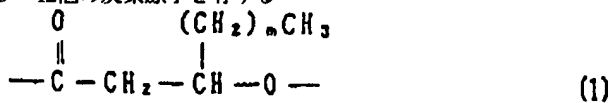


ここで、mは2～8の整数である。

【請求項4】次の構造式(1)を有する単位と次の構造式(2)を有する単位とから構成されるポリエステルを、6～12個の炭素原子を有する非分岐1-オレフィン

の1種またはそれ以上と、6～12個の炭素原子を有する\*

\*非分岐パラフィンまたはパラフィン酸化物の1種またはそれ以上含有する炭素源を用いることによって、生産することを特徴とする特許請求の範囲第1項に記載の方法：



ここで、mは2～8の整数である。

【請求項5】6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いることによって、側鎖が3個の炭素原子を有する(m=2)ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項6】7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いることによって、側鎖が4個の炭素原子を有する(m=3)ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項7】6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを用いることによって、側鎖が3個および4個の炭素原子を有する(m=2および3)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項8】8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個および5個の炭素原子を有する(m=2および4)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項9】7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個および5個の炭素原子を有する(m=2、3および4)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

※【請求項10】9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が4個および6個の炭素原子を有する(m=3および5)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項11】8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個および/または7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個、5個および6個の炭素原子を有する(m=2、3、4および5)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項12】10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、6個および/または8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、5個および7個の炭素原子を有する(m=2、4および6)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項13】9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個、7個および/または8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個、5個、6個および7個の炭素原子を有する(m=2、3、4、5および6)共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項14】11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、7個および/または9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が4個、6個および8個の炭素原子を有する ( $m=6, 5$  および  $7$ ) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項15】10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個、7個、8個および/または9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個、5個、6個、7個および8個の炭素原子を有する ( $m=2, 3, 4, 5, 6$  および  $7$ ) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項16】12個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて、6個、8個および/または10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、5個、7個および/または9個の炭素原子を有する ( $m=2, 4, 6$  および  $8$ ) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項17】11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、12個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個、7個、8個、9個および/または10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組み合わせて用いることによって、側鎖が3個、4個、5個、6個、7個、8個および9個の炭素原子を有する ( $m=2, 3, 4, 5, 6, 7$  および  $8$ ) 共重合ポリエステルを生産することを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項18】7~11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いることを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項19】8~10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いることを特徴とする特許請求の範囲第2項から第4項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項20】窒素またはリン制限で前記好気培養を行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項から第19項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項21】窒素制限で前記好気培養を行うことを特徴とする特許請求の範囲第1項から第20項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項22】前記好気培養が、 $pH5\sim9$ 、好ましくは約7にて、および $37^{\circ}C$ を下まわる温度、好ましくは約 $30^{\circ}C$ で行われることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第21項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項23】前記好気培養が、好ましくは空気による飽和の約50%の溶存酸素分圧で、十分に攪拌して行われることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第22項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項24】前記好気培養が、二液相系で行われることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第23項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項25】栄養源制限による前記好気培養が、細胞密度が少なくとも $2g/l$ に達する、栄養源制限なしの対数増殖期後に、行なわれることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第24項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項26】栄養源制限による定常期に形成される前記バイオポリマー含有細胞が、該細胞のバイオポリマー含有の顕著な低下が起こる前に、採取されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第25項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項27】前記バイオポリマーが、前記採取細胞をスフェロプラストへ変換し、音波振動処理によってこれらを破碎し；そして遠心分離した後に形成される最上層を分離し；さらに必要に応じて、洗浄と乾燥を行うこと、によって単離されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第26項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項28】前記バイオポリマーが、化学的に修飾されることを特徴とする特許請求の範囲第1項から第27項のいずれか1つに記載の方法。

【請求項29】光学的に活性なカルボン酸またはエステルを製造する方法であって、

特許請求の範囲第1項から第28項のいずれか1つに記載の方法により生産されるポリエステルを加水分解すること；および

必要に応じて、得られたモノマーをエステル化することを特徴とする方法。

【発明の詳細な説明】

(産業上の利用分野)

本発明は、栄養源制限下における微生物の好気培養によるポリエステルの製造方法に関する。

(従来の技術)

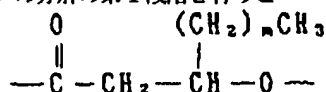
このタイプの方法はヨーロッパ特許公開公報第0015669号に開示されている。そこでは、PHBと呼ばれるポリ

(3-ヒドロキシ酪酸)の調製が述べられている。この調製は、あるメチロバクテリウム オルガノフィラム (*Methylobacterium organophilum*) 株の栄養制限下、特に窒素および/またはリンの制限下における好気培養による。使用し得る炭素源は、安価なメタノールである。他の微生物もまたPHBの製造を目的として提案されている。それには例えば、ローロッパ特許公開公報第0046344号に開示されているアルカリゲネス (*Alcaligenes*) 種およびAppl. Microbiol. Biotechnol. 23 (1986) 332-329に記述のあるシュードモナス (*Pseudomonas*) 株がある。

微生物学的手段により生産されるPHBは、正分解性であり、式 $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ を有する単位から構成される光学活性のポリエステルである。このバイオポリマーは非常に興味深い性質を有しており、そして、多くの用途に用いられ得る。このポリマーは他の熱可塑性プラスチックと同様に型に入れ成型でき、無機充填剤で補強でき、繊維に紡ぐことができ、そして良好な気体遮断特性を有するフィルムの調製に使用できる。この生分解性のPHBは、非生分解性のポリマーとともに混合ポリマー形に変換できる。具体的な利用には、PHBによる外科用糸および人工皮膚または人工骨の調製がある。また、光学活性PHBは、光学活性モノマーに変換され得（それは化学的手段によっては光学的に純粋な形には容易に製造することができない）、有機化学的変換、例えば薬剤の合成、の適当な出発材料となる。

しかし、PHBの欠点は、このポリマーの化学構造の変更が容易ではないということである。この欠点は、米国特許第4,477,654号によれば、アルカリゲネス種の好気培養を、少なくとも一部においては、カルボン酸（例えばプロピオン酸）、またはアルカリ金属塩またはその低級アルキルエステルの存在下で、行うことにより回避できる。このようにして形成されたバイオポリマーは、構造式 $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O}-$ を有する3-ヒドロキシ酪酸エステル残基と、構造式 $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_2\text{H}_5)-\text{O}-$ を有する残基のような他のヒドロキシ酸残基（50モル%を下回る）から形成される。しかし、この既知の方法においても、変更の可能性は極めて制限されている。（発明の構成）

本発明者が属している研究グループは、シュードモナス オレオボランス (*Pseudomonas olovorans*) 種の微生物の研究を行っている。種々のシュードモナス種は炭素源として直鎖または芳香族炭化水素を用いることにより生育でき、資化は炭素付加で始まる。この酸素付加はオキシゲナーゼにより触媒され、この遺伝情報は大部分プラスミドに関係している。そのプラスミドは、既知のOCT, CAM, TOL, XYL, SAL, およびNAHプラスミドであり、それぞれ6~12個の炭素原子を含むn-アルカン；カンファー；トルエン、m-キシレンおよびp-キシレン；サリチル酸塩；およびナフタレンの分解の第1段階を行うこ\*



（ここで、nは2~8の整数である。）

この生産は、6~12個の炭素原子を含む1種またはそれ以上のパラフィン、またはパラフィン酸化物を含む炭素源を用いて行われる。ここで使用される“パラフィン酸化物”という用語は、アルカノール、アルカナル、およびアルカン酸を意味し、それらはパラフィン分解の中間体として生じる。これら他の基質は、シュードモナス オレオボランス株をOCTプラスミドが存在しない状

\*とができる。モノオキシゲナーゼω-ヒドロキシラーゼをコードするOCTプラスミドを含むシュードモナス オレオボランス株は、6~12個の炭素原子を含むn-アルカンで生育し得る。なぜなら、末端のメチル基はヒドロキシル基に変換され、その後、そのアルデヒドおよびそのカルボン酸を経て変換され、正常な代謝に適合する産物を生じる。これらの株はまた、1-オクテンおよび1,7-オクタジエンのような種々の不飽和炭化水素に生育できることが見出されており、その第1の段階は、しばしば1,2-エポキシイドの形成である。

De Smetらが、J. Bacteriol. 154 (1983) 870-878で述べているように、シュードモナス オレオボランスTF4-1L (ATCC 29347) の、20~50% (V/V) のn-オクタンを含む栄養培地での培養において、細胞中には封入体が存在した。この封入体は、例えばバチルス セレウス (*Bacillus cereus*) の既知のポリ-β-ヒドロキシ酪酸エステル封入体に似た封入体である。さらに、これらの封入体は少なくとも一部は構造式 $\text{CO}-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{C}_6\text{H}_{11})-\text{O}-$ を有するβ-ヒドロキシオクタン酸エステルの単位から構成されるポリマー物質を含んでいることが示された。

広範囲のポリエステル型のバイオポリマーがシュードモナス オレオボランス細菌の好気培養で製造され得ることが、現在では見出されている。そして、これが本発明の本質である。この方法においては、このバイオポリマーの化学構造または組成が基質を選ぶことにより容易に制御され得る。本発明においては、側鎖の長さが調節され得、そして、所望の位置に末端二重結合を有するポリエステル型バイオポリマーの生産が可能となる。

本発明方法では、シュードモナス オレオボランス細菌を、過剰の炭素源と生育に必須の他の栄養源の少なくとも1種の制限量とを含有する栄養培地で、好気条件下にて培養することを特徴とする。上記炭素源は、少なくとも1種の資化可能な非環状脂肪族炭化水素化合物を含み、そして必要に応じて形成されたバイオポリマーを細胞から回収する。

飽和側鎖を含むバイオポリマーのみを生ずる本発明の方法は、構造式(1)を有する単位から構成されるポリエステルを生産によって特徴づけられる。

(1)

※態で、そして少なくとも活性パルフィンヒドロキシラーゼが存在しない状態で用いられる場合に、特に好適であるパラフィン酸化物の炭素原子数は、あるいは、6~12個の範囲を外れる範囲（例えば4個または4個の炭素原子）であり得る。なぜなら、パラフィンの6~12個という炭素原子の制限は、パラフィン-ヒドロキシラーゼ系の制限に関係するためである。

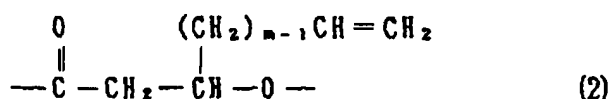
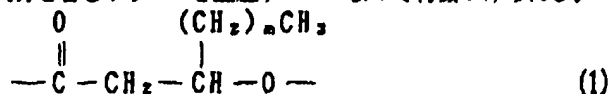
パラフィン（またはパラフィン酸化物）は、好ましく

9

10

は、側鎖のない化合物であるが、側鎖のある化合物も同様に用いられ得、ポリマーになり得る。

飽和および不飽和側鎖の両方を含むポリマーを生産す\*



(ここで、 $m$ は2～8の整数である。)

この生産は、6～12個の炭素原子を含み、側鎖を持たない1種またはそれ以上の1-アルケン、および必要に応じて6～12個の炭素原子を含み、側鎖を持たない1種またはそれ以上のパラフィンまたはパラフィン酸化物を含む炭素源を用いて行われる。1-アルケンを唯一の炭素源として用いる場合においても、生成するバイオポリマーの側鎖の一部は飽和している。しかし、飽和および不飽和側鎖の比率は、基質の混合物(例えばオクタンおよびオクテン)を用いることにより変化させ得る。

本発明のこの変法は、特に利点を有している。末端の二重結合のために、得られるバイオポリマーは側鎖の割合を制御して化学的に容易に修飾または他のポリマー鎖と架橋し得る。

本発明の好適な実施態様は、6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用いて、側鎖が3個の原子を有する( $m=2$ )ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。ヘキセン、またはヘキセンおよびヘキサンを含む基質を用いる場合には、バイオポリマーの側鎖の一部は末端二重結合を含む。

本発明の他の好適な実施態様は、7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用い、側鎖が4個の炭素原子を有する( $m=3$ )ポリエステルを調製することにより特徴づけられる。側鎖の一部に末端二重結合を有するポリエステルは、用いられる基質がヘプテン、またはヘプテンおよびヘプタンである場合に得られる。

上記の好適な実施態様は両者とも、本質的に、全ての側鎖が同数の炭素原子を有するポリエステルの生産である。以下に述べる好適な実施態様は、そのような例ではない。

本発明のそのような好適な実施態様は、6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を用い、側鎖が3個および4個の炭素原子を有する( $m=2$ および3)共重合ポリエステルの生産により特徴づけられる。これらおよび全ての他の実施態様において、基質の選択およびそのお互いの比率の両者において多くの変更が可能であり、そして、これらの変更は、バイオポリマーにおける種々の側鎖の比率を事実上無限に変えることができる。従ってこの実施態様においては、次の組合せが用いられ得る：ヘキサンおよびヘプタン；ヘキセンおよびヘプテ

\*本発明の方法は、構造式(1)を有する単位と構造式(2)を有する単位とで構成されるポリエステルを生産によって特徴づけられる。

10※ン；ヘキサンおよびヘプタン；ヘキセンおよびヘプタン；ヘキサン、ヘキセンおよびヘプタン；ヘキサン、ヘキセンおよびヘプテン；ヘキサン、ヘプタンおよびヘプテン；ヘキセン、ヘプタンおよびヘプテン；そしてヘキサン、ヘキセン、ヘプタンおよびヘプテン。そして、これらの組合せのそれぞれにおいて、種類の基質間の比率は所望の値に選択することができる。

他の実施態様は、8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質、そして、必要に応じて6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用いて、側鎖が3個および5個の炭素原子を有する( $m=2$ および4)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。好適な基質は1-オクテンであり、必要に応じてオクタン、ヘキサンおよび/またはヘキセンが組合せて用いられる。

次に、好適な実施態様は、7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて6個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個および5個の炭素原子を有する( $m=2, 3$ , および4)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

さらに好適な実施態様は、9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が4個および6個の炭素原子を有する( $m=3$ および5)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

さらに他の好適な実施態様は、8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個および/または7個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個、5個および6個の炭素原子を有する( $m=2, 3, 4$ および5)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

次の好適な実施態様は、10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて6個および/または8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、5個および7個の炭素原子を有する( $m=2, 4$ および6)共重合ポリエステルの生産することにより特徴づけられる。

※50

## 11

さらに好適な実施態様は、9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて、6個、7個および/または8個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個、5個、6個および7個の炭素原子を有する ( $m=2,3,4,5$ および6) 共重合ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。

さらに他の好適な実施態様は、11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて7個および/または9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて、側鎖が4個、6個および8個の炭素原子を有する ( $m=3,5$ および7) 共重合ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。しかし、他の好適な実施態様は、10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて6個、7個、8個、および/または9個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個、5個、6個、7個および8個の炭素原子を有する ( $m=2,3,4,5,6$ および7) 共重合ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。

次の好適な実施態様は、12個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質を、必要に応じて6個、8個および/または10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、5個、7個および9個の炭素原子を有する ( $m=2,4,6$ および8) 共重合ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。さらに好適な実施態様は、11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と、12個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質とを、必要に応じて6個、7個、8個、9個および/または10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質と組合せて用い、側鎖が3個、4個、5個、6個、7個、8個および9個の炭素原子を有する ( $m=2,3,4,5,6,7$ および8) 共重合ポリエステルを生産することにより特徴づけられる。

本発明によれば、好ましくは7~11個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質、最も好ましくは8~10個の炭素原子を有する1種またはそれ以上の基質が用いられる。このようにして、最大量のポリマーが細胞内に得られる。

シュードモナス オレオバランス細菌の好気培養が達成される様式および条件は当業者には既知である。培養は、回分法または連続法が有効であり得る。この好気培養は、 $pH5\sim9$ 、好ましくは約7において $37^{\circ}C$ 以下の温度、好ましくは約 $30^{\circ}C$ において行われ、そしてこの好気培養は、溶存酸素圧が好ましくは空気飽和の約50%を超える値であり、十分な攪拌を行うことにより行われることが推奨される。

この好気培養は2液系で行うことができ、そして、それが望ましい。2液系の相のうちのひとつは、水溶性栄養源および上記細菌を含む水相であり、そして他方は基質の炭化水素を含む非極性相である。

## 12

上に述べたPHB生産微生物の場合のように、このシュードモナス オレオバランスは生育に必須の栄養源の1つが枯渇するまでは、有意な量のポリマーを生産しない。適当な栄養源の制限は、例えば、窒素、リン酸、イオウおよびマグネシウムの制限であるが、これらのうち、Nの制限およびPの制限が高ポリマー収量という観点からは好ましい。これらのうち、Nの制限が実際に容易に行われ、その理由から最も好適である。

実際にはこの方法は、通常、細胞密度が少なくとも $2g/l$ に達するまで栄養源制限なしで対数増殖を行い、次に栄養源を制限した好気培養を行うような方法である。

バイオポリマー中に封入体が形成される定常期はあまり長く続けてはならない。なぜならば最大値に達した後、このポリマーの濃度は再び減少するからである。従って、好ましくは、栄養源制限で定常期に形成されたバイオポリマー含有細胞は、細胞中のバイオポリマー含有の有意な低下が起こる前に、集菌される。

細菌に含まれているバイオポリマーは必ずしも単離する必要がない。なぜならば、バイオポリマー封入体を有する細菌細胞を、例えば米国特許第3,107,172号に開示されているように、直接用いることができるためである。しかし、大部分の用途には、このポリマーの単離精製することが望ましいか、もしくは必要である。この目的のために、多くの既知方法が採用され得る。この細菌細胞は、当業者に既知の多くの方法で破碎され得る。例えば、剪断力を用いること (ホモジナイザー、グライNDER、いわゆる“フレンチプレス”など)、浸透圧ショック処理を用いること、音波または超音波振動を用いること、酵素的細胞壁分解を行うこと、または細胞懸濁液をスプレードライすることが採用され得る。ついで、ポリマーは、多くの既知方法により他の成分から分離され得る。それには、例えば、溶剤抽出および遠心分離による方法がある。適当な分離方法の1つは上述のDe Smetらの報告に述べられており、それによれば等密度遠心分離が用いられる。大規模スケールでバイオポリマーを単離するには、次の方法が好適である。まず、集菌した細胞をスフェロプラストにし、音波振動処理で破碎し、そして遠心後上層を分離し、さらに必要に応じて洗浄と乾燥を行う。好ましくは、スフェロプラストへの変換は、蔗糖の存在下において行うことが有効である。遠心分離は、10,000gで約30分間行えば充分である。ポリマーはそこで上清に白い最上層を形成し、容易に分離できる。混入物は洗浄により除去でき、そして、洗浄されたポリマーを適当な方法で乾燥、好ましくは凍結乾燥に付す。

非常に好適な他の単離法は次のとおりである。まず、細胞を連結遠心分離により集菌し、つぎに凍結乾燥する。乾燥細胞を、例えばクロロホルムに懸濁し、次に還流条件下で、例えば4時間にわたり抽出を行う。冷却後、懸濁液を浄過し、例えば50~100mlの容量までエボパレートする。得られたポリマー溶液は、このポリエ



テル以外に大量の脂質および脂肪酸を含有する。これらを、例えば、10倍量のエタノール中でポリマーを沈澱させることにより除去する。ポリマーが沈澱後、上澄をデカンテーションで除き、ポリマーの沈澱を圧縮空気を上に流すことにより乾燥させる。ポリマーを次に、好ましくは、できるだけ少量のクロロホルムに溶解させ、ついで、過剰、10倍量のエタノールで再沈澱させる。得られた沈澱を再び最小容量のクロロホルムに溶解させ、その後、上記溶液を鋳型に注ぎ、蒸発させることにより、合成プラスチック材が得られる。蒸発はこの材料を真空下でしばらくの間50℃に保持することにより促進される。

このようにして得られるポリエステルは、該ポリエステルから、その全体または一部が構成される、縫糸、フィルム、皮膚、または骨移植材などの製品に利用され得る。

上記PHBについて記載した利用はまた、本発明により生産されたポリエステルにも適用される。特に注目されるのは、得られたバイオポリマーを化学的に修飾する可能性であり、この可能性はこのポリエステルが末端に二重結合を有する側鎖を含む場合に、特にうまく実現される。他のポリマー鎖との架橋もまた可能である。

本発明はまた、光学的に活性なカルボン酸またはエステルを生産する方法を提供し、それは、本発明により生産されたポリエステルの加水分解、および必要に応じて行われる生じたモノマーのエステル化により特徴づけられる。上述のように、そのような光学活性化合物は、化学的手段を用いた場合は、光学的に純粋な形で容易に得られない。本発明は従って、そのような光学的に純粋な化合物の製造を容易に達成する方法を提供する。それには例えば、薬剤の製造における中間体、または純粋に科学的なおよび/または応用を指向した研究への利用性があり得る。使用した基質の相異により、このプロセスにより異なったモノマーが生じた場合には、必要に応じてこれらは既知方法（モノマーの鎖長および/または飽和度の違いを利用した方法）により分離され得る。

本発明は、次の実験により詳述される。

#### 1. バイオポリマーの構造

オクタンによる生育の間のシュードモナス オレオボランスによる重合物質の生合成は、1983年にDe Smetらにより初めて示された。このポリマーは、メタノリシスされたモノマーの元素分析、赤外吸収スペクトル、およびガスクロマトグラフィーにより、ポリ-3-ヒドロキシブチレート様 (PHA) ポリエステル、おそらくポリ-3-ヒドロキシオクタノエートと同定された。その後、3つの同定化合物が、有機化学的な経路で合成され (Ketelaarら, Tetrahedron Letters 26 (1985), 4665-4668), その後このポリマーの絶対構造の決定が可能となった。

メタノリシスされたモノマーと、合成された (S)-3-ヒドロキシヘキサノエート メチルエステル、

(S)-3-ヒドロキシオクタノエート、メチルエステル、および (S)-3-ヒドロキシデカノエート メチルエステルとを比較することによって、シュードモナス オレオボランスによりオクタンで生育後に形成されるポリマーは、(R)-3-ヒドロキシヘキサノエートおよび (R)-3-ヒドロキシオクタノエートから成ることが確立された。オクタンでの生育後に形成されるポリマーの一般的な構造式を第1図に示す。第1図において、Rはアルキル基  $(CH_2)_mCH_3$ 、またはアルケニル基  $(CH_2)_{m-1}-CH=CH_2$ 、を示し、ここでmは2~8整数である。基質としてオクタンを用いる場合には、バイオポリマーは、モノマー (R)-3-ヒドロキシヘキサノ酸エステル ( $R=C_3H_7$ ) と、(R)-3-ヒドロキシオクタン酸エステル ( $R=C_5H_{11}$ ) との共重合体である。

形成される他のポリマーにおけるモノマーの同定 (以下参照) は、そのポリマーの酸メタノリシスが有効であり、その後精製したモノマーのメチルエステルを、ガスクロマトグラフィーと連結したマススペクトロメトリーで分析した。

#### 2. 分析

細胞内に貯蔵されるポリマーの形成に関する反応動力学を分析するために、ポリマーの量を短時間で少量の培養試料 (バイオマス) で測定し得る手段を用いて、再現性のある方法を開発した。この方法は、微生物バイオマス中のポリ-3-ヒドロキシブチレートの測定に対する Brauneggら (Eur. J. Microbiol. Biotechnol. 6 (1978) 29-37) の方法に基づいて開発した。

その方法によると、細胞培養の全試料を同時に加水分解とメタノリシスを行い、その後ポリマーから形成されたモノマーのメチルエステルを、ガスクロマトグラフィーで分析する。2つのピークの典型的なガスクロマトグラフィーとマススペクトルを第2図に示す。第2図Aはオクタンで培養した細胞の分析後のGLCパターンを示す。矢印で示すピークは重合物質に由来する。t<sub>r</sub>=5分のピークは内部標準 (安息香酸メチルエステル) である。第2図Bは最も重要なGLCピークのMSパターンを示す。175におけるピークは3-ヒドロキシオクタン酸メチルエステルモノマーのプロトン化型であり、192におけるピークはNH<sub>4</sub>-3-ヒドロキシオクタン酸メチルエステルを示す。第2図Cは、より小さいGLCピークのMSパターンを示す。147および164におけるピークはそれぞれ3-ヒドロキシヘキサノ酸メチルエステルのプロトン化誘導体およびアンモニウム誘導体を示す。

この方法をシュードモナスのポリマーに対して開発するために、n-オクタンによるシュードモナス オレオボランスの定常培養の同一細胞試料を、100℃にて様々な時間により、そしてメタノール中における種々の濃度の硫酸で加水分解を行った (第3図)。第3図は、オクタンで生産されたバイオポリマーの加水分解時およびメタノリシス時におけるインキュベーションの時間および硫

## 15

酸濃度の、バイオポリマー量に対する効果を示すグラフである。測定には同一の細胞ペレットが用いられた。抽出時間をさらに最適化し、GLC試料の乾燥操作を導入した後、分析を以下のようにプログラムた：

0.1~4.0ml容量の細胞試料をエッペンドルフ遠心管で3分間遠心分離し、次いで上清を除去し、ペレットを凍結乾燥する。ついで、この凍結乾燥ペレットを15% (V/V) の硫酸を含むメタノール溶液2mlに再懸濁し、2mlのクロロホルムを加える。ネジ蓋のある試験管で、これら試料を100℃で140分間、マグネティックスターラーで攪拌しながら、インキュベートする。試料を氷上で冷却後、1.0mlの水を加え、モノマー化したメチルエステルを、試験管の内容物を20秒間ボルテックスミキサーにかけて抽出する。遠心分離（5分間、4000×g）で層分離を促進させた後、水層を除き、有機層を無水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上で乾燥する。次いで、これら試料を、内部標準として安息香酸メチルエステルを用いてガスクロマトグラフィーにかける。

この分析の直線性を第4図に示す。この分析によると、試料あたり9mgのバイオポリマーまで、この反応は一次反応である。

### 3. 生育の間におけるバイオポリマーの生成および窒素制限

第9項を除く全ての実験は、シュードモナス オレオボランスTF4-1L (ATCC 29347) を用いて行った。

醗酵には、シュードモナス オレオボランスを、250mlのエーレンマイヤーフラスコ中で、2%オクタンを含む50mlのF培地により、30℃にて振盪プレート（200rpm）上で16時間（一晚）前培養した。E培地は、以下の組成である：

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.2g/ℓ
クエン酸三ナトリウム	2.0g/ℓ
NaNH <sub>4</sub> · HPO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.5g/ℓ
K <sub>2</sub> PHO <sub>4</sub>	10.0g/ℓ
1000* MT	1 ml/ℓ

1000\* MTは、1N HCl中の胞子成分の溶液であり、他の成分を殺菌した後に加える。1000\* MTは、以下の組成である：

FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.78g/ℓ
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	1.98g/ℓ
CoSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.81g/ℓ
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	1.47g/ℓ
CuCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.17g/ℓ
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.29g/ℓ

を1N HClに溶解する。

本培養は、1ℓの醗酵槽（連結攪拌タンク反応容器、CS TR）に500mlのE\*培地を入れ、生育の最適値であるpH 6.9に維持して、コンピューター制御で5% NH<sub>3</sub>と1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を加えて行った。醗酵の間、酸素分圧（溶存酸素分圧D.O.T.）を60%空気飽和に、空気流入管のコンピュー

## 16

ター制御バルブを用いて維持した。培地は、600rpmの速度で攪拌した。

E\* 培地は、以下の組成を有する：

K <sub>2</sub> PHO <sub>4</sub> · 3H <sub>2</sub> O	7.5g/ℓ
NaNH <sub>4</sub> PHO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	3.5g/ℓ
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7g/ℓ
1000* MT	1 ml/ℓ
100mM MgSO <sub>4</sub>	10 ml/ℓ

1000\* MTと殺菌MgSO<sub>4</sub>溶液のみを、他の成分を殺菌した後に加えた。単一炭素源およびエネルギー源として、10~20% (V/V) のオクタンを加えた。この培地をアンモニアによるpH滴定と組合せて用いると、6.5mg/mlの細胞密度を得るのが可能であった。

全醗酵を通して、細胞密度（Witholt, J. Bacteriol. 109 (1972) 350-364）とポリマー形成量（第2項による）を、試料を取ることによってモニターした。

第5図Aは、対数増殖期（μ<sub>max</sub>=0.48）の間に、事実上バイオポリマーの生産がないことを示す。しかし、生育速度が、栄養源の1（この場合は窒素）の制限により低下すると、ポリマー形成が始まる（最大で細胞乾燥重量の15%）。

この窒素制限は、以下のように行った：

N制限：E\* 培地は、2N KOHおよび1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加することによって、培養pHを調整して用いた。このようにすると、2mg/mlの細胞密度が達成され得る。

### 4. 他の制限によるバイオポリマーの形成

シュードモナス オレオボランスを第3項に記載のように前培養した。本培養には、制限する栄養源に依存して、改変E\* 培地を用いた：

30 P制限：E\* 培地を40倍に希釈し、窒素をNH<sub>4</sub>Clの形で17mMまで加えて、用いた。培養pHは、2N KOHおよび2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で一定に維持した。この培地に存在するリン酸は、2mg/mlまで、細胞増殖を可能にする。

S制限：E\* 培地に、100mM MgSO<sub>4</sub>に代えて、ある量のMgSO<sub>4</sub>を加えて最終濃度を0.4mMとし、そしてある量のMgCl<sub>2</sub>を加えて最終濃度を0.6mMとした。pHは、5%アンモニアを用いて調製した。この培地では、2mg/mlの細胞密度が可能である。

40 Mg制限：E\* 培地に、100mM MgSO<sub>4</sub>に代えて、ある量のMgSO<sub>4</sub>を加えて最終濃度を0.1mMとし、そしてある量のMgSO<sub>4</sub>を加えて最終濃度を0.9mMとした。pHは、5%アンモニアを用いて調製した。この培地では、1mg/mlの細胞密度が達成し得る。

全醗酵の間、培養の細胞密度および生成ポリマーの量を、上の第3項に示したように測定した。

これらの培地を用いることにより、ポリマーの生成が種に定常期に起こることが再び見られる。上記の制限に依存して、細胞乾燥重量当りのバイオポリマーの百分率は、第5図に示すように変動する。第5図Aは窒素の制限、第5図Bはマグネシウムの制限、第5図Cはリン酸

塩の制限、そして第5図Dはイオウの性げを行った場合のものである。黒丸は細胞密度、そして白丸はバイオポリマーの量を示す。以下の表1は、これら栄養源制限の生成ポリマー量に対する効果を示し、細胞乾燥重量の百分率で示した。

表1：ポリマー生成に対する制限の効果

制限	ポリマー(%)
P	15
S	7
Mg	10
N	15

一般に、ポリマーの生成は、窒素とリン酸制限下で最良であると結論し得る。

#### 5. 他のパラフィンによるポリマーの形成

表2：種々のn-アルカンに対してシュードモナス オレオボランスにより生成されるバイオポリマーおよびその組成

炭素源	ポリマーの量 (1)	醗酵時間 (時間)(2)	ポリマー組成 (3)						
			3-OH-C6	3-OH-C7	3-OH-C8	3-OH-C9	3-OH-C10	3-OH-C11	3-OH-C12
ヘキサン	1.2	22	1						
ヘプタン	6.7	22		1					
オクタン	12.5	31	0.11		0.89				
ノナン	9.2	27		0.33		0.67			
デカン	12.5	31	0.10		0.66		0.24		
ウンデカン	8.4	54		0.23		0.63		0.14	
ドデカン	3.4	54	0.02		0.31		0.36		0.31

(1) バイオポリマーの最大量であり、単位はg/g細胞乾燥重量。

(2) バイオポリマーの量が最大に達する醗酵時間であり、単位は時間。

(3) バイオポリマーにおける種々のモノマーの相対的な組成：

3-OH-C6：3-ヒドロキシ-ヘキサノエート

3-OH-C7：3-ヒドロキシ-ヘプタノエート

3-OH-C8：3-ヒドロキシ-オクタノエート

3-OH-C9：3-ヒドロキシ-ノナノエート

3-OH-C10：3-ヒドロキシ-デカノエート

3-OH-C11：3-ヒドロキシ-ウンデカノエート

3-OH-C12：3-ヒドロキシ-ドデカノエート

シュードモナス オレオボランスが全てのこれらパラフィンに対してポリマーを生成し得ることがわかる。最良の増殖基質であることが知られている基質、すなわちオクタンおよびノナンは、ポリマー形成に最良の基質でもある。ポリマーの組成は、用いた基質に依存する。炭素数が偶数のパラフィンで生育後、炭素数が偶数のモノマーが全例で形成され、そして炭素数が奇数のパラフィンは、常に炭素数が奇数のモノマーとなる。これらモノマーは、常に3-ヒドロキシ-アルカノエートであり、鎖長が基質の長さからC<sub>6</sub>に変動する。C<sub>8</sub>およびC<sub>9</sub>モノマ※50

\* 上記の第4項で述べたように決定した、ポリ-3-ヒドロキシ-アルカノエート生成の最適条件を用いて、他のパラフィンを、ポリマー形成のための基質としての可能を調べた。シュードモナス オレオボランスがC<sub>6</sub>~C<sub>12</sub>のn-パラフィンで生育し得ることを示す文献があるので、これらの化合物をまず調べた。

前培養の上を第3項のように行い、そして本培養を上記の第4項の窒素制限条件で行った。細胞密度およびポリマーの百分率は、上の第3項に示すように測定した。

10 増殖およびポリマー形成の結果を第6図に要約する。第6図において、使用されたパラフィンは、n-ヘキサン(第6図A)、n-ヘプタン(第6図B)、n-ノナン(第6図C)、n-デカン(第6図D)、n-ウンデカン(第6図E)、およびn-ドデカン(第6図F)である。黒丸は細胞密度を、そして白丸はバイオポリマーの量を示す。表2は、ポリマーの最大生成量、この最大値に達す

\* 時間、および生成ポリマーのモノマー組成を示す。

※一に対して、ポリマー生成酵素は最大の特異性を有するようである。

#### 6. オレフィンによるバイオポリマーの形成

シュードモナス オレオボランスは、またn-オレフィンを唯一の炭素源およびエネルギー源として利用できるのかどうかを検討した。この研究のための醗酵は、上の第5項に従って行った。細胞密度およびポリマーの百分率は、第3項に示すように定量した。

これら不飽和パラフィンによって生育した後に生成し

19

たポリマーは、パラフィンポリマーとは異なった組成を有するようになる。該生成ポリマーは、モノマーの一部が末端二重結合を含むという点において異なる。

n-オクテンによって生成するポリマーの場合、このような二重結合を有するモノマーの量は、全体の55%であった。オクテンによって生成したポリマーの加水分解物の典型点のGCスペクトルを第7図に示す。ピークの最初の集団は、3-ヒドロキシヘキセン酸エステルと3-ヒドロキシヘキサン酸エステルとの存在を示す。第2のピーク対は3-ヒドロキシオクテン酸エステルと3-ヒドロキシオクタン酸エステルとの存在を示す。不飽和化合物は、それぞれの場合において、GLC/MSで分析されるように、より短い保持時間を有する。対応するピークを矢印で示す。オクタンおよびオクテンによって生成したポリマーのIRスペクトルを第8図に示す。二重結合によるピーク（矢印で示す）が明瞭に見られる。

表3は、種々のオレフィンによって生育した後に生成したポリマーの最大量、この最大値に達するのに必要な時間、およびポリマーを構成するモノマーを示す。

表3: n-アルケンによって生育したシュードモナス オレオボランスによるバイオポリマーの生産

炭素源	ポリマーの量(%)	発酵時間(時間)	モノマー (1)
n-オクテン	8.0	25.0	3-OH-6:0;3-OH-6:1; 3-OH-8:0;3-OH-8:1
n-ノネン	6.3	24.0	3-OH-9:0;3-OH-9:1
n-デセン	3.4	26.0	3-OH-8:0;3-OH-8:1; 3-OH-10:0;3-OH-10:1

(1): バイオポリマーにおける種々のモノマー成分

3-OH-6:0;3-ヒドロキシヘキサノエート  
3-OH-6:1;3-ヒドロキシ-5-ヘキサノエート  
3-OH-7:0;3-ヒドロキシヘプタノエート  
3-OH-7:1;3-ヒドロキシ-6-ヘプタノエート  
3-OH-8:0;3-ヒドロキシオクタノエート  
3-OH-8:1;3-ヒドロキシ-7-オクタノエート  
3-OH-9:0;3-ヒドロキシノナノエート  
3-OH-9:1;3-ヒドロキシ-8-ノナノエート  
3-OH-10:0;3-ヒドロキシデカノエート  
3-OH-10:1;3-ヒドロキシ-9-デカノエート  
3-OH-11:0;3-ヒドロキシウンデカノエート  
3-OH-11:1;3-ヒドロキシ-10-ウンデカノエート  
3-OH-12:0;3-ヒドロキシドデカノエート  
3-OH-12:1;3-ヒドロキシ-11-ドデカノエート

シュードモナス オレオボランスは、1-オクテン、1-オネン、および1-デセンによってバイオポリマーを生成する能力があることが示される。しかし、ヘキセンによって生育させた場合は、ポリマー形成が見られなかつ

20

た。ポリマーがこれらのモノマーから構成される様式は、n-パラフィンによって生成するポリマーの場合と類似している。しかし、1-デセンによる生育の間に形成されるバイオポリマーが、検出し得る量のC<sub>6</sub>モノマーを含んでいないことは驚きである。

試験した1-オレフィンによって得られた結果によれば、バイオポリマー形成が1-ヘプテン、1-ウンデセン、および1-ドデセンによっても起こることが期待され得る。

7. n-オクタン/1-オクテン混合物によるポリマーの形成

1-オクテンによる生育の間、形成されたポリマーは、飽和モノマーおよび不飽和モノマーの両方を含むことが乱された。不飽和モノマーの量が、0（オクタンによる生育）と55%（オクテンによる生育；第6項参照）の間のポリマーを生成するために、シュードモナス オレオボランスをこれら2つの基質の混合物で培養した。

醗酵は、1ℓの攪拌タンク反応容器で、第3項のように行った。すべての場合に、全量20%の有機炭を加えた。細胞密度およびポリマーの百分率は、第3項に示したように定量した。

表4は、二重結合を有するモノマーの割合が、用いた基質の組成に依存してどのように変化するかを、モノマー組成と共に示す。示した値は、細胞のポリマー含量が最大の時に測定した値である。

表4: 1-オクテン/n-オクタン混合物によって生育した後のシュードモナス オレオボランスによるバイオポリマーの生産

n-オクタン/1-オクテン	バイオポリマーにおけるC-C二重結合の割合	バイオポリマー組成			
		6:0	6:1	8:0	8:1
100:0	0.0	0.11	0	0.89	0
75:25	8.2	0.07	0.001	0.85	0.08
50:50	18.4	0.06	0.01	0.75	0.18
25:75	30.2	0.03	0.01	0.67	0.29
0:100	54.4	0.07	0.07	0.38	0.48

40 パラフィンおよびオレフィンの混合物から出発すると、ポリマーにおける二重結合の百分率を変化させ得ると結論される。従って、生育基質の組成がポリマーのモノマー組成を決定する（部分的に）。

8. 他の炭化水素によるポリマーの形成

n-パラフィン（第5項参照）および1-オレフィン（第6項参照）によるポリマー生成に加えて、他の置換炭化水素または不飽和炭化水素を炭素源とした場合にも、ポリマー生成が起こり得るか否かを検討した。シュードモナス オレオボランスは、全てのこれら基質に低構成を有さないかも知れないので、これら基質はn-オ

## 21

クタンとの1:1混合物で加えられた。

醗酵は、第3項のように、1ℓの攪拌タンク反応容器で、10～15%の有機層を用いて行った。

表5は、このようにして試験した基質、およびこの場合に、種々のモノマーを有するポリマーが実際生成するか否かを示す。また、オクタン分解の第1中間体である1-オクタノールが、生育およびポリマーの基質として用い得るかどうか調べた。これは、1-オクタノールを唯一の炭素源およびエネルギー源として、シュードモナス オレオボランスを培養した場合に見出された。

ポリマー生成が、またさらに酸化されたパラフィン（オクタノール、オクタン酸）による生育の間にも起こることが期待される。

表5:他の炭化水素による生育の間のシュードモナス オレオボランスによるバイオポリマーの形成

基質	バイオポリマー形成	生育 <sup>1</sup>
n-オクタン	+	卅
1-オクタノール	+	卅
2-オクテン	+	+
2-メチル-1-オクテン		卅
1-オクチン	-	+
4-オクチン		+
1,3-オクタジエン		+
1,4-オクタジエン		+
2,2-ジメチルヘプタン		+
2,2-ジメチルオクタン		卅
2-オクタン	-	-
n-ジブチルエーテル	+	+

1 “生育”で示した欄における記号は、次の意味である:

- 生育しない,
- + 最終OD値が1と5の間である中程度の生育,
- 卅 最終OD値が5と10の間である適度の生育,
- 卅 最終OD値が10を超えるオクタンによる生育に匹敵する良好な生育。

#### 9.他の菌株によるオリマーの形成

上に述べたすべての実験は、シュードモナス オレオボランスTF4-IL (ATCC 29347)を用いて行った。この菌株は、時々GPo-1と呼ばれる。この野性型に加えて、数多くの関連菌株を、オクタンまたは1-オクタノールによる生育後のポリマー形成について調べた:

GPo-12:OCTプラスミドを保持しないGPo-1,

PpG-1:シュードモナス プチダ,Chakrabartyにより分離されたものでプラスミドを含まない,

PpG-6:OCTTプラスミドを保持するPpC-1,

## 22

PpS-124:CAM/OCT融合プラスミドを保持するPpG-1。

これらの菌株は、250mlのエーレンマイヤーフラスコ中の50mlE\* 培地（第3項参照）で、4%オクタン、または10CTプラスミドがない場合には、4%1-オクタノールを、唯一の炭素源およびエネルギー源として用いて試験した。

表6:GPo-1関連菌株によるポリ-3-ヒドロキシオクタノエートの生産

菌株	プラスミド	基質	ポリマーの量(%) <sup>(1)</sup>	
			50mlの培養物中	プレート上
GPo-1	OCT	オクタン	5.9	
GPo-1	OCT	1-オクタノール	2.9	
GPo-12	-	1-オクタノール	-	6.1
PpG-1	-	1-オクタノール	7.7	24.8
PpG-6	OCT	オクタン	1.8	
PpS-124	CAM/OCT	オクタン	0.02	+(2)

(1): 細胞乾燥重量あたりの百分率であるが、絶対的な最大値ではない。

(2): 明らかに検出可能。

プラスミドを保持しない株、すなわちPpG-1が、細胞内にポリ-3-ヒドロキシオクタノエートを蓄積する事実から、ポリマー合成に関与する酵素がプラスミドではなく、染色体にコードされていると結論し得る。

得られた結果は、またアルコール、アルデヒド、カルボン酸、ジアルカノール、ジアルデヒドおよびジカルボン酸を単一炭素源として用いる場合にも、ポリマー生成が起こることを証明するか、あるいは示唆する。

#### 10.ポリ-3-ヒドロキシアルカノエートのポリマー特性

精製ポリ-3-ヒドロキシオクタノエート-3-ヒドロキシヘキサノエート (PHOH) および精製ポリ-3-ヒドロキシオクタノエート-3-ヒドロキシオクタノエート-3-ヒドロキシヘキサノエート-3-ヒドロキシヘキサノエート (PIOHU) の分子量 (MW)、融点 (T<sub>m</sub>) およびガラス転移温度 (T<sub>g</sub>) を決定した。得られた値を表7に示す。比較のために、ポリ-3-ヒドロキシブチレート (PHB) の値も示す。

23  
表7: ポリマーの特性

ポリマー	MW(g/mol)	T <sub>m</sub> (°C)	T <sub>g</sub> (°C)
PHB	8.0×10 <sup>5</sup>	167	-4
PHOH	2.8×10 <sup>5</sup>	56	-35
PHOHU	2.8×10 <sup>5</sup>	-*	-35

\* -は、この場合、ポリマー物質が完全に非結晶性なので、融点が存在しないことを意味する。

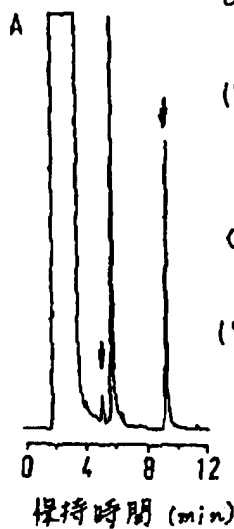
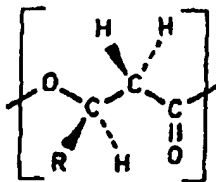
(発明の要約)

本発明は、シュードモナス オレオボランス細菌を、ある栄養源を含む基質で培養することによってポリエステルバイオポリマーを生成する方法に関する。該ポリエステルの性質は、用いる炭素源の性質を変化させることにより変化させ得る。このようにして、不飽和二重結合を有するポリエステルをも生産し得る。該ポリエステルから光学活性なカルボン酸またはエステルが生産される。該ポリマーは、縫糸、フィルム、皮膚および骨移植材などの製品を製造するのに利用し得る。

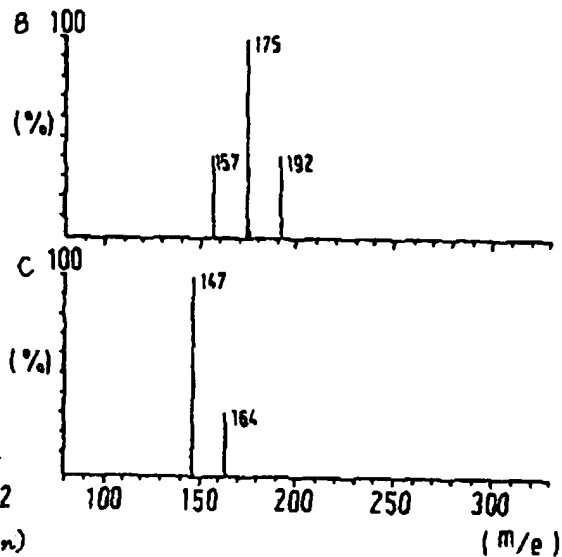
【図面の簡単な説明】

第1図は本発明方法により生産されるバイオポリマーの

【第1図】



【第2図】



構造単位的一般式を示す。

第2図Aは、オクタンで生産されたバイオポリマーのガスクロマトグラフィー (GLC)、そして第2図BおよびCは、マスペクトル (MS) の結果を示す。

第3図はシュードモナス オレオボランス培養物の試料中におけるバイオポリマーの定量分析の結果を示すグラフである。

第4図はポリ-3-ヒドロキシアルカン酸エステルの分析において、用いた細胞量に対する相対GLC応答のプロットである。

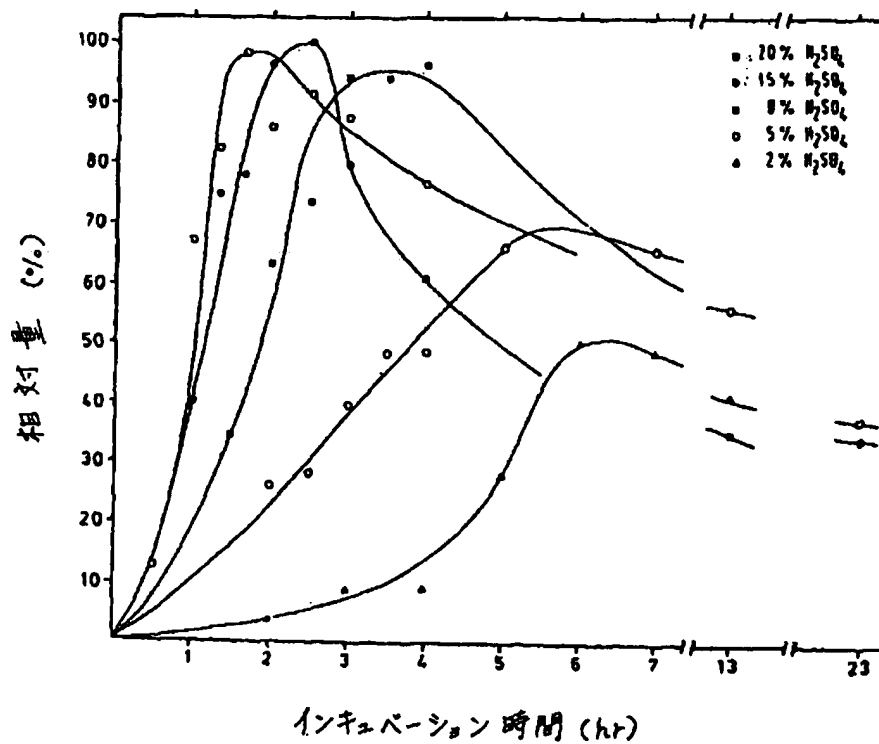
第5図A~Dは、培地中の栄養源制限と、n-オクタンを用いたときのバイオポリマー生産との関係を示す。

第6図は、窒素制限下で種々のn-パラフィンにおいて増殖したシュードモナス オレオボランスによるポリ-3-ヒドロキシアルカン酸エステルの生産を示す。

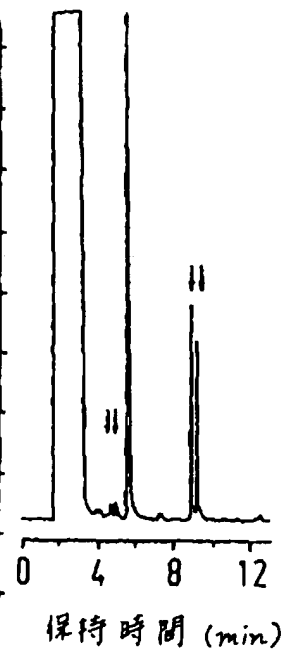
第7図は1-オクテンで増殖したシュードモナス オレオボランスにより生成したバイオポリマーのGLC分析の結果を示す。

第8図はオクタン (第8図A) とオクテン (第8図B) とで生成するバイオポリマーの赤外スペクトルを示す。

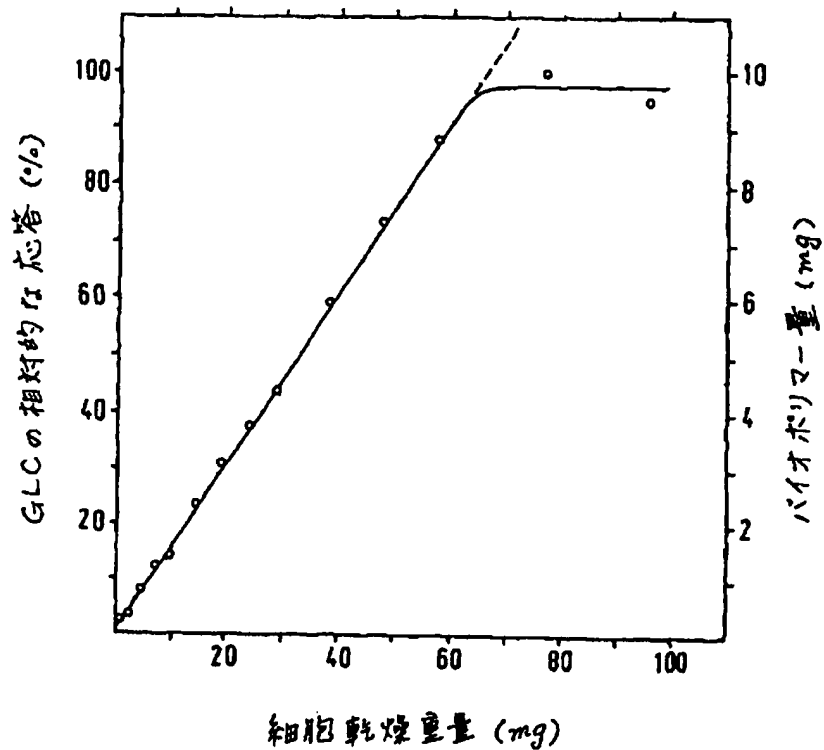
【第3図】



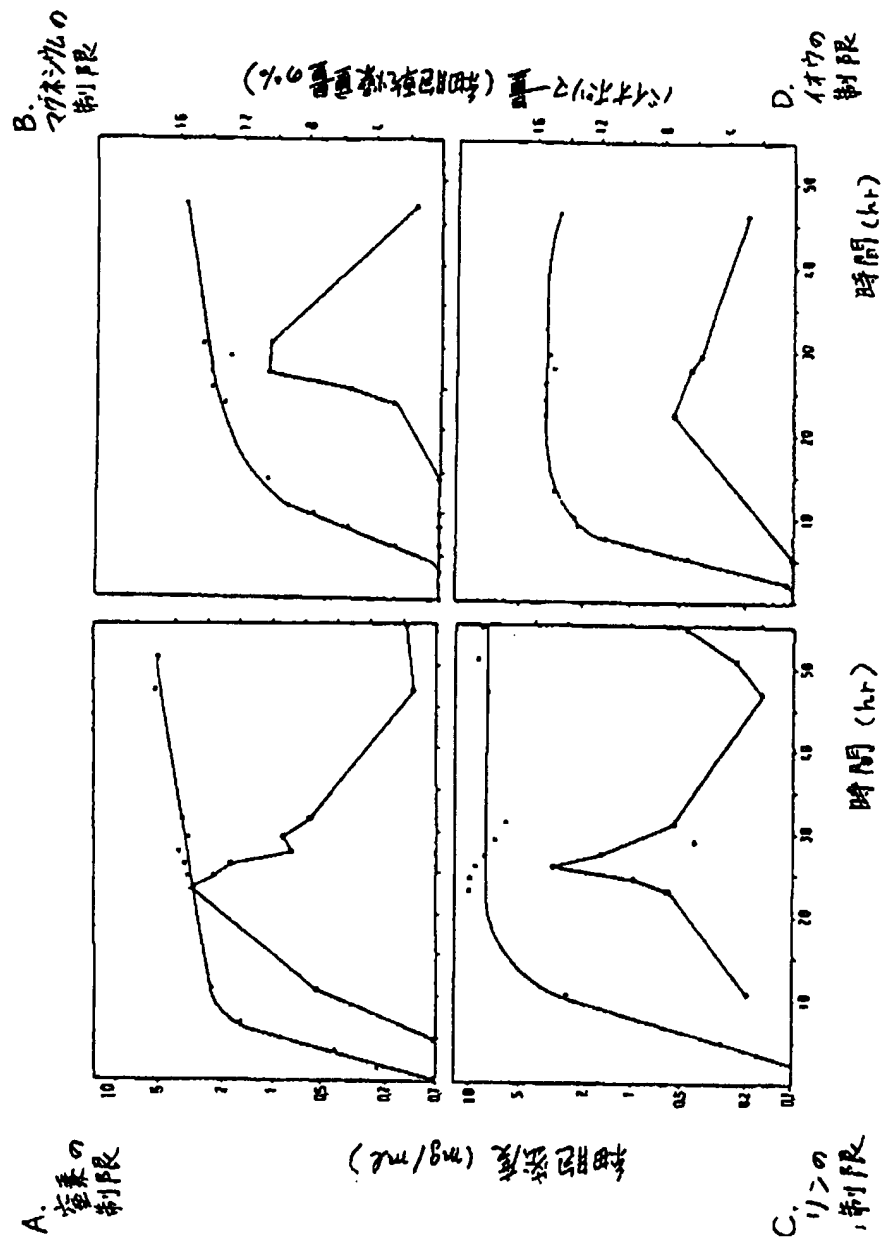
【第7図】



【第4図】

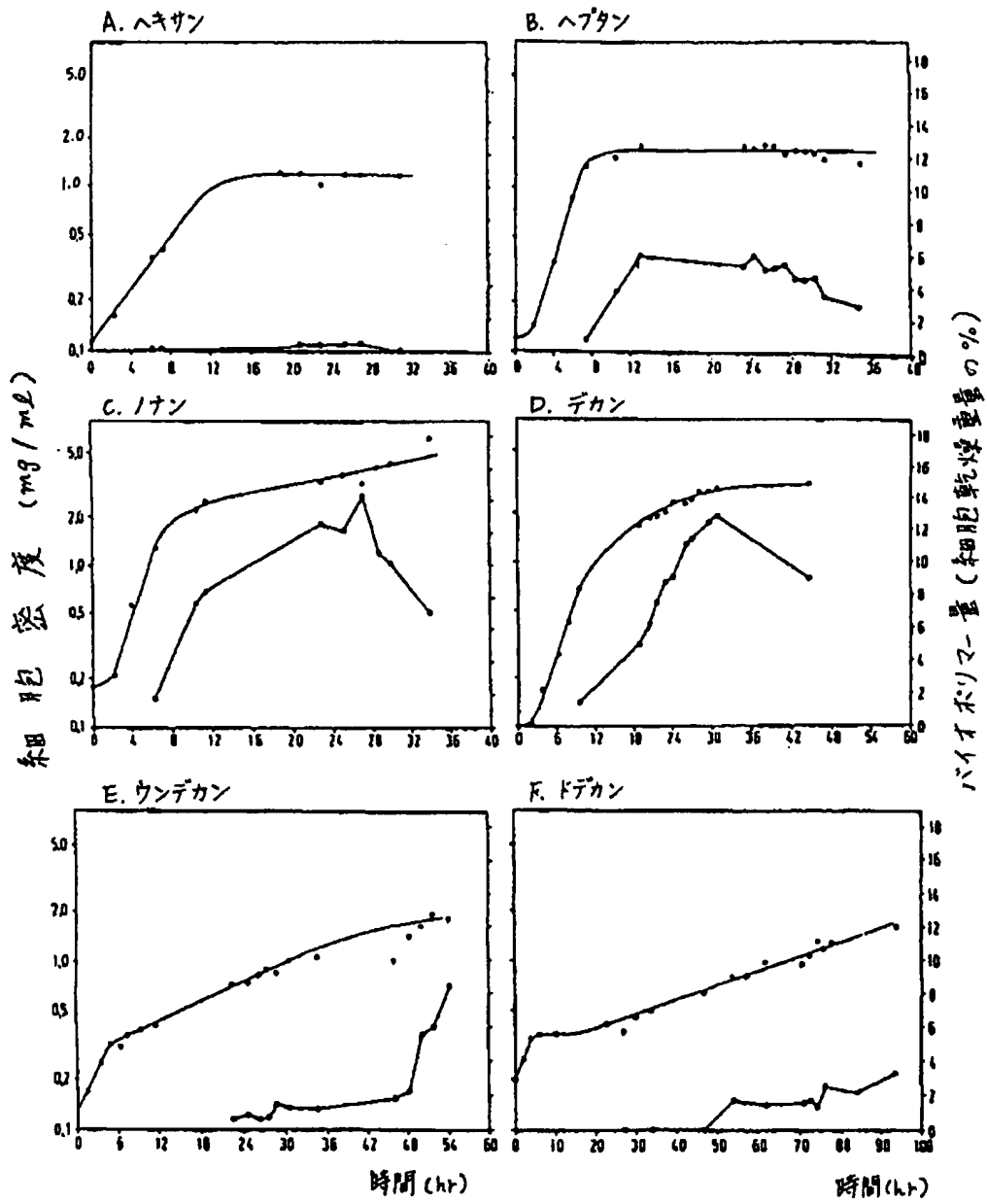


【第5図】

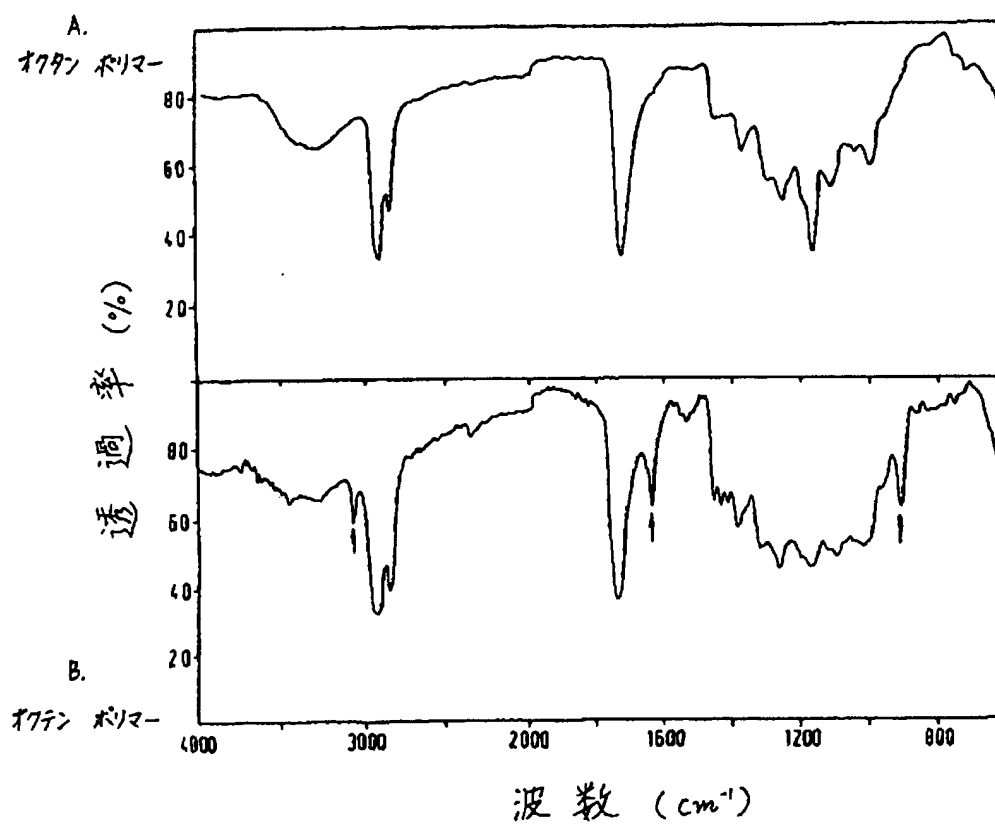




【第6図】



【第8図】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>  
C08L 67/02  
(C12P 7/62  
C12R 1:38)

識別記号  
LPD

庁内整理番号

FI  
C08L 67/02

LPD

技術表示箇所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:



**BLACK BORDERS**

- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

This Page Blank (uspto)